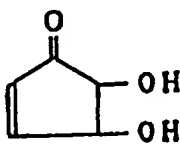




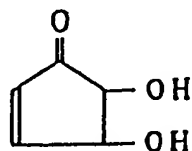
PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 31/12, A23K 1/16</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/41196</p> <p>(43) 国際公開日 1998年9月24日(24.09.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00816</p> <p>(22) 国際出願日 1998年2月26日(26.02.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/82376 1997年3月17日(17.03.97) 特願平9/210193 1997年7月22日(22.07.97) 特願平9/225533 1997年8月8日(08.08.97)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 寶酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 佐川裕章(SAGAWA, Hiroaki)(JP/JP) 小山信人(KOYAMA, Nobuto)(JP/JP) 蝶野英人(CHONO, Hideto)(JP/JP) 竹迫一任(TAKESAKO, Kazutoh)(JP/JP) 加藤郁之進(KATO, Ikumoshin)(JP/JP) 〒520-2193 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内 Shiga, (JP)</p>	<p>(74) 代理人 弁理士 安達光雄, 外(ADATI, Mituo et al.) 〒550-0001 大阪府大阪市西区土佐堀1丁目6番20号 新栄ビル6階 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: ANTIVIRAL AGENTS</p> <p>(54)発明の名称 抗ウィルス剤</p> <div style="text-align: center;">  <p>[I]</p> </div> <p>(57) Abstract Antiviral agents characterized by containing as the active ingredient at least one compound selected from among 4,5-dihydroxy-2-cyclopenten-1-one of formula (I), optical isomers thereof, and salts of them.</p>		

(57) 要約

下記式〔I〕で表される4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つ以上の化合物を有効成分として含有することを特徴とする抗ウイルス剤。



〔I〕

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GB	英国	LV	ラトヴィア	TD	チャド
AU	オーストラリア	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GH	ガーナ	MD	モルドバ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バルバドス	GN	ギニア	MK	マケドニア	TR	トルコ
BE	ベルギー	GW	ギニア・ビサウ		ラヴィニア共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BG	ブルキナ・ファソ	GR	ギリシャ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BJ	ブルンジ	GU	グアム	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BR	ブラジル	DE	ドイツ	MR	モーリタニア	US	米国
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CA	カナダ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ベトナム
CC	中央アフリカ	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CG	コンゴ共和国	IT	イタリア	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CH	スイス	JP	日本	NO	ノルウェー		
CI	コートジボワール		ケニア	NZ	ニュージーランド		
CM	カメルーン	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CN	中国	KR	韓国	PT	ポルトガル		
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
CY	キプロス	LC	セント・ルシア	RU	ロシア		
CZ	チェコ	LI	スイス	SD	スーダン		
DE	ドイツ	LK	スリランカ	SE	スウェーデン		
DK	デンマーク	LS	レソト	SG	シンガポール		
EE	エストニア			SI	スロベニア		
ES	スペイン			SK	スロバキア		
				SL	シエラ・レオネ		

明 細 書

抗ウイルス剤

発明の属する技術分野

本発明は、抗ウイルス作用により、病原生物に対し有用な医薬及び飲食品に関する。

従来の技術

抗ウイルス作用を考える場合、細胞へのウイルス感染の阻害、感染細胞でのウイルスの増殖の阻害等のウイルス抵抗能を誘導する作用、ウイルス感染した細胞を選択的に死滅させる作用、及びウイルス自身を不活化する（感染力をなくす）作用が考えられる。

ウイルス自身を不活化する作用を持つものとしてウイルスに対する中和抗体がある。またこのような抗体を誘導する方法としてワクチンがある。しかし、ワクチン投与による抗体誘導は、ウイルス感染の予防には効果的であるが、現時点では抗体を用いる効果的な治療法はあまりない。更に、ウイルスを直接不活化する薬剤による効果的な治療法もない。

ウイルス抵抗能を誘導する作用としては、ウイルスゲノムの複製阻害、ウイルス遺伝子の転写阻害、ウイルスタンパクの合成阻害、ウイルスタンパクのホールディング阻害等が考えられる。このような作用を誘導するには、細胞内の転写因子の活性あるいは発現の抑制、ウイルス由来の転写因子の活性あるいは発現の抑制、熱ショックタンパクの誘導等がある。このような作用を誘導するものとして、プロスタグランジンが挙げられる。

またウイルス感染細胞を選択的に死滅させるものとしては、抗ヘルペスウイルス薬として用いられているアシクロビル、ガンシクロビル、ソリブジン等がある。

発明が解決しようとする課題

ウイルスに対しては、単独の作用で対処するより、複合的作用で対処した方が効果的である。例えば、ウイルス感染細胞を選択的に死滅させる物質を投与しても、感染細胞が死に至るまでの間に、ウイルスが産生され他の細胞に感染するた

め、ウイルスを完全に除去するのは非常に困難である。一方、ウイルス抵抗性を誘導する作用を持った物質を投与しても、感染細胞を除去することはできない。

本発明の目的は、細胞にウイルス抵抗性を誘導する機能、及びウイルス感染細胞を選択的に死滅させる機能を有する化合物を開発し、該物質を有効成分とする抗ウイルス剤、肝機能改善剤、熱ショックタンパク誘導剤、がん遺伝子発がん防癌剤、化学発がん抑制剤等の医薬品、及び抗ウイルス用食品又は飲料を提供することにある。

課題を解決するための手段

本発明者らはかかる目的を達成するために鋭意検討した結果、細胞にウイルス抵抗性を誘導する機能を有し、且つウイルス感染細胞を選択的に死滅させる機能を有する化合物を作用させると、ウイルス感染細胞が選択的に傷害を受け、なおかつ死に至るまでに産生されるウイルス量が減少すること、またそのため、感染細胞が死に至るまでに産生されたウイルスに新しく感染する細胞も減少すること、更に、ウイルス未感染の細胞もこの化合物の投与により前もってウイルス抵抗性を獲得しているため、新しく感染してもウイルスの増殖が抑制されること、すなわち、細胞にウイルス抵抗性を誘導する機能を有し、且つウイルス感染細胞を選択的に死滅させる機能を有する化合物は、ウイルスの除去、例えばヒト後天性免疫不全ウイルス、又はC型肝炎ウイルスの除去に極めて効果的であることを見出した。

本発明において使用する化合物の細胞にウイルス抵抗性を誘導する機能は、ウイルス感染前の細胞に化合物を作用させた後、ウイルスの細胞への感染阻害、ウイルスゲノムの複製阻害、ウイルス遺伝子の転写阻害、ウイルスタンパクの合成阻害、ウイルスタンパクのホールディング阻害等を指標として測定することができる。

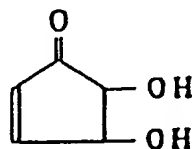
またウイルス感染細胞を選択的に死滅させる機能はウイルス感染細胞と非感染細胞の生存率を比較することにより測定することができる。

細胞にウイルス抵抗性を誘導する機能を有し、且つウイルス感染細胞を選択的に死滅させる機能を有する化合物としては、該両機能を有すれば良く何ら限定は

ない。

そして、本発明者らは、細胞にウイルス抵抗性を誘導する機能を有し、且つウイルス感染細胞を選択的に死滅させる機能を有する化合物として、式〔I〕で表される化合物、4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン（以下、単にシクロペンテノンと称す）若しくはその光学活性体又はその塩を見出し、発明を完成させた。

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は下記式〔I〕で表される4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つ以上の化合物を有効成分として含有することを特徴とする抗ウイルス剤に関する。



〔I〕

本発明の第2の発明は式〔I〕で表される4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つ以上の化合物を含有することを特徴とする抗ウイルス用食品又は抗ウイルス用飲料に関する。

本発明の好ましい態様において、ウイルスとしてはヒト後天性免疫不全ウイルス、又はC型肝炎ウイルスが例示される。また抗ウイルス剤としてはヒト用抗ウイルス剤、非ヒト動物用抗ウイルス剤（例えば家畜、家禽、魚類又はエビ類用抗ウイルス剤）、又は植物用抗ウイルス剤が例示される。

図面の簡単な説明

図1はCEM-S S細胞を用いた場合のシクロペンテノン濃度と細胞生存率の関係を示す図である。

図2はH9細胞を用いた場合のシクロペンテノン濃度と細胞生存率の関係を示す図である。

図3はCEM-3B細胞を用いた場合のシクロペンテノン濃度と細胞生存率の関係を示す図である。

図4はH9-3B細胞を用いた場合のシクロペンテノン濃度と細胞生存率の関係を示す図である。

図5はシクロペンテノンの発がん抑制作用を示す図である。

図6は(-)体シクロペンテノンのp-ジメチルアミノベンゾイル誘導体のCD及び(-)体シクロペンテノンの立体構造を示す図である。

図7は(+)体シクロペンテノンのp-ジメチルアミノベンゾイル誘導体のCD及び(+)体シクロペンテノンの立体構造を示す図である。

発明の実施の形態

本発明において使用する式〔I〕で表されるシクロペンテノンは、4位と5位のヒドロキシル基の立体配置がシスの異性体とトランスの異性体の双方を包含する。本発明においてはシス体シクロペンテノンを用いても良いし、トランス体シクロペンテノンを用いても良いし、シス体シクロペンテノンとトランス体シクロペンテノンの混合物を用いても良い。また、これらの光学活性体を用いても良い。

。

シス体シクロペンテノンは化学合成法によって得られる〔ヘルベチカ キミカ アクタ (Helvetica Chimica Acta)、第55巻、第2838~2844頁(1972)〕。トランス体シクロペンテノンは化学合成法によっても得られるし〔カーボハイドレート リサーチ (Carbohydrate Res.)、第247巻、第217~222頁(1993)〕、またウロン酸、例えばグルクロン酸、ウロン酸誘導体、例えばグルクロノラクトン、又はこれらの含有物等を加熱処理することによっても得られる(PCT/JP97/03052号明細書参照)。本発明ではシクロペンテノンを含むこれらの加熱処理物、その部分精製物及び精製物が使用できる。

例えば、ウロン酸としてD-グルクロン酸を使用し、その1%溶液を121℃で4時間加熱処理することにより、加熱処理物中にシクロペンテノンが生成される。この加熱処理物中のシクロペンテノンを溶媒で抽出し、抽出物を濃縮する。

次にこの濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、溶出するシクロペンテノン画分を濃縮し、濃縮物からシクロペンテノンをクロロホルムで抽出し、抽出濃縮物の順相カラムクロマトグラフィーを行うことにより、加熱処理物中のシクロペンテノンが単離される。

シクロペンテノンの物性を下記に示す。なおシクロペンテノンの質量分析はDX302質量分析計（日本電子社製）を用いて行った。また、重クロロホルム溶媒を用いたNMRスペクトルの測定はJNM-A500（日本電子社製）を用いた。比旋光度はDIP-370型旋光計（日本分光社製）、UV吸収スペクトルはUV-2500分光光度計（島津製作所社製）、赤外吸収スペクトル（IR）はFTIR-8000赤外分光光度計（島津製作所社製）をそれぞれ用い測定した。

MS m/z 115 $[M+H]^+$

1H -NMR ($CDCl_3$)

δ 4.20 (1H, d, $J=2.4$ Hz, 5-H)、4.83 (1H, m, 4-H)、6.30 (1H, dd, $J=1.2, 6.1$ Hz, 2-H)、7.48 (1H, dd, $J=2.1, 6.1$ Hz, 3-H)

但し、 1H -NMRの化学シフト値は $CHCl_3$ の化学シフト値を7.26 ppmとして表した。

旋光度: $[\alpha]_D^{20} 0^\circ$ (c 1.3, 水)

UV: λ_{max} 215 nm (水)

IR (KBr法): 3400、1715、1630、1115、1060、1025 cm^{-1} に吸収を有する。

単離されたシクロペンテノンを光学分割することにより、(-)-4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び(+)-4,5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを得ることができる。当然、合成方法により得られたシクロペンテノンも光学分割することができる。

例えば、シクロペンテノンをエタノールに溶かす。このエタノール溶液にヘキサン/エタノール(94/6)を更に加え、シクロペンテノン溶液を調製する。この

試料溶液を、例えばキラルパック AS（ダイセル化学工業）カラムを用いカラム温度：40℃、移動相：ヘキサン／エタノール（94/6）でHPLCを行うことにより、シクロペンテノンを経験分割することができる。

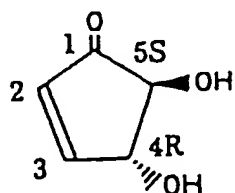
分割された（－）－トランス－4，5－ジヒドロキシ－2－シクロペンテン－1－オン〔以下、（－）体シクロペンテノンと称する〕の旋光度は $[\alpha]_D^{20} - 105^\circ$ （ c 0.30、エタノール）であり、（＋）－トランス－4，5－ジヒドロキシ－2－シクロペンテン－1－オン〔以下、（＋）体シクロペンテノンと称する〕の旋光度は $[\alpha]_D^{20} + 104^\circ$ （ c 0.53、エタノール）である。なお旋光度は前記のDIP-370型旋光計（日本分光社製）を用いて測定した。

次に（－）体シクロペンテノン及び（＋）体シクロペンテノンのそれぞれの質量分析、核磁気共鳴法（NMR）による構造解析、UV吸収スペクトルの測定、赤外吸収スペクトルの測定を上記記載の方法に準じ行う。その結果、両光学活性体は光学分割前のシクロペンテノンと同一の結果を示す。

光学分割された（－）体シクロペンテノン及び（＋）体シクロペンテノンをそれぞれp－ジメチルアミノベンゾイル誘導体とし、J-720型円二色性分散計（日本分光社製）を用い、円二色性スペクトル（CD）を測定し、その結果をジベンゾエートキラリテイルールに適用し〔ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサイエティ（J. Am. Chem. Soc.）、第91巻、第3989～3991頁（1969）〕、その立体配置を決定した。

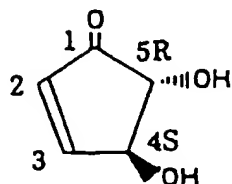
（－）体シクロペンテノンのp－ジメチルアミノベンゾイル誘導体のCD及び

（－）体シクロペンテノンの立体構造を図6に示す。図中縦軸はモル円二色性、横軸は波長（nm）を示す。なお、上記立体構造を、式〔II〕として下記に示す：



〔II〕

(+) 体シクロペンテノンの *p*-ジメチルアミノベンゾイル誘導体の CD 及び
 (+) 体シクロペンテノンの立体構造を図 7 に示す。図中縦軸はモル円二色性、
 横軸は波長 (nm) を示す。なお、上記立体構造を、式 [III] として下記に示
 す：



[III]

図 6、7 及び式 [II]、式 [III] に示すように (−) 体シクロペンテノンは
 (−) − (4 R, 5 S) − トランス − 4, 5 − ジヒドロキシ − 2 − シクロペンテ
 ン − 1 − オン、(+) 体シクロペンテノンは (+) − (4 S, 5 R) − トランス
 − 4, 5 − ジヒドロキシ − 2 − シクロペンテン − 1 − オンである。

以上、本発明に使用するシクロペンテノン又はその光学活性体はいかなる方法
 で製造しても良く、明細書で開示の方法で製造しても良く、化学合成方法で合成
 しても良く、シクロペンテノンのトランス体、シス体及びそれらの混合物も本発
 明に使用される。当然、化学合成法で得られたシクロペンテノンの光学活性体も
 本発明で開示の光学活性体に包含される。

シクロペンテノン又はその光学活性体の塩としては、医薬として許容される塩
 があり、公知の方法にて変換することができる。

本発明で使用する、細胞にウイルス抵抗性を誘導する機能を有し、且つウイル
 ス感染細胞を選択的に死滅させる機能を有する化合物、例えばシクロペンテノン
 若しくはその光学活性体又はそれらの塩は抗ウイルス作用を有し、これらの化合
 物から選択される少なくとも 1 つの化合物を有効成分として抗ウイルス剤を作製
 することができる。

すなわち細胞にウイルス抵抗性を誘導する機能を有し、且つウイルス感染細胞
 を選択的に死滅させる機能を有する化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用
 担体と組合せ製剤化すれば抗ウイルス剤を製造することができる。抗ウイルス剤

の製造は一般的には、細胞にウイルス抵抗性を誘導する機能を有し、且つウイルス感染細胞を選択的に死滅させる機能を有する化合物、例えばシクロペンテノン、若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤であることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分である細胞にウイルス抵抗性を誘導する機能を有し、且つウイルス感染細胞を選択的に死滅させる機能を有する化合物、例えばシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される1以上の化合物を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製される。

本発明の抗ウイルス剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

抗ウイルス剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される細胞にウイルス抵抗性を誘導する機能を有し、且つウ

ウイルス感染細胞を選択的に死滅させる機能を有する化合物、例えばシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される1以上の物の量が成人1日当たり0.1 μg ~ 20 mg/kgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。また細胞にウイルス抵抗性を誘導する機能を有し、且つウイルス感染細胞を選択的に死滅させる機能を有する化合物、例えばシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を抗ウイルス剤、抗ウイルス用食品又は飲料の原料として用いても良い。

本発明で使用する、細胞にウイルス抵抗性を誘導する機能を有し、且つウイルス感染細胞を選択的に死滅させる機能を有する化合物、例えばシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩は、DNAウイルス、RNAウイルス、レトロウイルス、及びウイロイドに対して抗ウイルス活性を示す。

従って、ヒト用抗ウイルス剤、非ヒト動物用抗ウイルス剤、例えば家畜、家禽、養殖動物、例えば魚類、エビ類等のウイルス病に有効な抗ウイルス剤、植物用抗ウイルス剤、例えば花卉類、野菜類等の農園芸作物のウイルス病に有効な抗ウイルス剤等、有用生物用の抗ウイルス剤として使用することができる。

動物に感染するDNAウイルスとしては例えばボックスウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、B型肝炎ウイルス、パピローマウイルス、ポリオマウイルス、エプスタインバーウイルス、パキキュロウイルスが挙げられ、植物に感染するDNAウイルスとしては例えばカリフラワーモザイクウイルスが挙げられる。動物に感染するRNAウイルスとしては例えばロタウイルス、風疹ウイルス、日本脳炎ウイルス、デング熱ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、麻疹ウイルス、おたふくかぜウイルス、ジステンパーウイルス、インフルエンザウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ヒトポリオウイルス、A型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスが挙げられ、植物に感染するRNAウイルスとしては例えばタバコモザイクウイルス、麦類矮小ウイルス、イネ縞葉枯ウイルス、タバコ輪点ウイルスが挙げられる。レトロウイルスとしては例えば成人T細胞白血病ウイルス、ヒト

後天性免疫不全ウイルスが挙げられ、ウイロイドとしては例えばジャガイモスピンドルチューバーウイロイドが挙げられる。

シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩は非ヒト哺乳動物、鳥、例えばニワトリ及び七面鳥、冷血動物、例えば魚のウイルス病の治療及び予防に有効であり、これらの化合物は下記の非ヒトウイルスに対して抗ウイルス活性を示す。サイリド ヘルペスウイルス1型、カプリド ヘルペス1型、ラガモルフ ヘルペスウイルス1型、ファシアニド ヘルペスウイルス1型、ファシアニド ヘルペスウイルス2型、ターキー ヘルペスウイルス1型、アナチド ヘルペスウイルス1型、キャット フィッシュ ヘルペスウイルス1型、エクイド ヘルペスウイルス3型、ボビド ヘルペスウイルス1型、ボビド ヘルペスウイルス3型、ボビド ヘルペスウイルス4型、ピッグ ヘルペスウイルス1型、ピッグ ヘルペスウイルス2型、ミュリッド ヘルペスウイルス1型、セピド ヘルペスウイルス1型、セピド ヘルペスウイルス2型、ツパイド ヘルペスウイルス1型、カニン ヘルペスウイルス1型、ヒライン ヘルペスウイルス1型、エクイド ヘルペスウイルス1型、エクイド ヘルペスウイルス2型。

本発明の抗ウイルス剤を鳥類に注射するか又は飼料若しくは飲料水に添加する等の獣医術、飼育術において周知の方法によって、マーレック氏病等の鳥類のウイルス性疾患が本発明に使用する化合物によって、予防及び／又は治療される。またプール、水槽、保持タンク又は飼育領域の水、海水等に直接、本発明に使用する化合物を添加するか、又は飼料中に本発明に使用する化合物を混合して、ヘルペス類ウイルス、例えばブチナマズウイルス、ヘルペスウイルス ソロモンズ、ナーカ ウイルス等のウイルス感染によるプール、水槽、保持タンク又は飼育領域中の狭い区域に棲息する魚のウイルス病、例えばサケ科魚類の伝染性造血器壊死病、ヘルペスウイルス感染症又は伝染性脾臓壊死病、ニジマスのウイルス性出血性敗血症、コイの春ウイルス病、種々の魚のリンホシスチス病、海産魚・遡河魚のウイルス性赤血球壊死病、ヒラメ等のラブドウイルス病、ブリ稚魚等のウイルス性脾臓壊死病、トラフグ等の口白病等を同様に予防及び／又は治療し得る。なお本発明に使用する化合物、本発明の抗ウイルス剤を投与するに当たっての

正確な規制は、必然的に治療されている個々の被検体に関する必要性、治療の種類及び飼育者の判断次第である。

本発明の抗ウイルス剤が投与された非ヒト動物はその健康保持により、生存率、成長率、産卵率等の改善が顕著である。

本発明で使用する、細胞にウイルス抵抗性を誘導する機能を有し、且つウイルス感染細胞を選択的に死滅させる機能を有する化合物、例えばシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩はこれらのウイルスタンパクの合成を抑制し、ウイルスゲノムの合成も抑制することにより、強い抗ウイルス作用を示す。またこれらのウイルス感染細胞を選択的に死滅させる。

例えばヒト後天性免疫不全ウイルス（以下HIV と略記する）の感染患者においても、すべてのCD4 陽性細胞にHIV が感染しているのではなく、一部の細胞にのみ感染している。本発明の抗ウイルス剤は、この感染細胞のHIV 増殖を抑制しながら選択的に感染細胞を死滅させ、未感染細胞にウイルス抵抗能を誘導し、細胞からのHIV の除去が可能となる。

シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩は上記抗ウイルス作用のほか、肝機能改善作用、熱ショックタンパク誘導作用を有し、シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される1以上の化合物を有効成分とする肝機能改善剤や熱ショックタンパク誘導剤を、上記抗ウイルス剤に準じ、製剤化することができ、抗ウイルス剤に準じた方法で投与することができる。

肝機能改善剤や熱ショックタンパク誘導剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有されるシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される1以上の化合物の量が成人1日当たり0.1 μ g ~ 20 mg / kg である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。またシクロペンテノン若し

くはその光学活性体又はそれらの塩から選択される1以上の化合物物を肝機能改善用飲食品、熱ショックタンパク誘導用飲食品の原料として用いても良い。

シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を摂取することにより、肝機能障害も改善され、GOT、GPT値が正常化する。

またシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩は70kダルトン(HSP70)等の熱ショックタンパク誘導活性を有し、肝炎ウイルス、エイズウイルス、インフルエンザウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ヘルペスウイルス等のRNAウイルス、DNAウイルスに対する抗ウイルス作用を有する。また、熱ショックタンパクはがん免疫に関与しており、また生体防御作用をも有する。シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を摂取することにより、インフルエンザウイルスによる風邪疾患等のウイルス性疾患が予防、治療できる。

なお熱ショックタンパクは細胞や個体が平常の温度よりも5～10℃程度高い温度変化を急激に受けたときに合成が誘導されるタンパクの総称であり、原核生物から高等真核生物まで幅広く分布している。真核生物の熱ショックタンパクとしてはHSP90、HSP70、ユビキチン、HSP26等が知られている。その中でHSP70は分子シャペロン的一种であり、フォールディングが完了していない、または不完全にフォールディングしたタンパクに結合して立体構造の形成を助ける。熱ショックタンパクのアミノ酸配列は進化の過程でよく保存されており、HSP70は大腸菌のDnaKタンパクと相同である。ヒトには約10個のHSP70遺伝子が存在しているが、これらのあるものは構成的に発現しており、あるものは様々な刺激によって誘導される。熱ショックタンパクの合成は熱ショックのほかに様々な化学物質、酸化ストレス等の細胞障害によっても誘導される。

C. アミチら (C. Amici) ら [ジャーナル オブ ビロロジ (Journal of Virology)、第68巻、第6890～6899頁 (1994)] は、 α 、 β -不飽和カルボニルを持つプロスタグランジンA₁の存在下でセンダイウイルスを感染させた動物細胞を培養するとHSP70とHSP90の合成が誘導され、HSP70の合成が

誘導されている間はウイルスタンパクの合成が抑制されることを報告している。また、A. ロッシ (A. Rossi) ら [ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)、第 271 巻、第 32192 ~ 32196 頁 (1996)] は、2-シクロペンテン-1-オンがプロスタグランジン A₁ と同様に HSP 70 の合成を誘導し、水疱性口内炎ウイルスタンパクの合成を抑制することを報告している。

本発明で使用するシクロペンテノンによる HSP 70 誘導能は 10 μ M でみられ、20 ~ 30 μ M で最大となるが、これは 2-シクロペンテン-1-オンが HSP 70 を誘導するには数百 μ M の濃度を要することと比較すると極めて高い誘導能であるといえる。これはプロスタグランジン A₁ による HSP 70 誘導能に匹敵するものであり、シクロペンテノンの分子量がプロスタグランジン A₁ の 3 分の 1 以下であるので重量濃度で比較するとプロスタグランジン A₁ よりも高い誘導能を持つといえる。

本発明で使用するシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩はこのように高い熱ショックタンパク誘導作用を持つことから、DNA ウイルス、RNA ウイルス、レトロウイルス、及びウイロイドに対して抗ウイルス活性を示す。これらのウイルス、ウイロイドには上記の各ウイルス、ウイロイドが例示される。

シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩はがん遺伝子で形質転換されたがん細胞に対しても増殖抑制活性を有し、がん遺伝子による発がんを防止する作用を有する。

例えばパピローマウイルスはパポバウイルス科 (papovaviridae)、パピローマウイルス属 (papillomavirus) の DNA ウイルスであり、ヒトパピローマウイルス (HPV) としては、例えば子宮頸がんなどの原因となる HPV16 型が知られている。

シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩は HPV16 型のがん遺伝子 E7 によってがん化した細胞に対し、増殖抑制効果を有し、シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つの化合物

を有効成分として、ウイルス発がん細胞増殖抑制剤を提供することができ、がん遺伝子による発がんを防止することができる。

またシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩はイニシエーターとプロモーターによる２段階発がんの抑制作用を有し、これらの化合物から選択される少なくとも一つの化合物を有効成分として、化学発がん抑制剤を提供することができる。

したがってシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つの化合物を含有する発がん予防用食品又は発がん予防用飲料を提供することができる。

シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つの化合物を有効成分として含有するがん遺伝子発がん防止剤又は化学発がん抑制剤は抗ウイルス剤に準じ、製剤化することができ、抗ウイルス剤に準じた方法で投与することができる。

本発明の抗ウイルス用食品又は抗ウイルス用飲料の製造においては細胞にウイルス抵抗を誘導する機能を有し、且つウイルス感染細胞を選択的に死滅させる機能を有する化合物、例えばシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を使用することができる。またシクロペンテノンを含むウロン酸の加熱処理物、該加熱処理物からの部分精製シクロペンテノン及び精製シクロペンテノンを使用することができる。

また肝機能改善作用、熱ショックタンパク誘導作用、発がん予防作用等を有する作用発現用食品又は作用発現用飲料の製造においても、シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩、シクロペンテノンを含む加熱処理物、該加熱処理物からの部分精製シクロペンテノン及び精製シクロペンテノンを使用することができる。

すなわちこれらのシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩、シクロペンテノンを含む加熱処理物、該加熱処理物からの部分精製シクロペンテノン及び精製シクロペンテノンから選択される原料を希釈及び／又は添加して、製造される食品又は飲料は本発明の抗ウイルス用食品又は飲料に包含される

。 本発明の抗ウイルス用食品又は抗ウイルス用飲料の製造法は、特に限定はないが、調理、加工及び一般に用いられている食品又は飲料の製造法による製造を挙げることができ、製造された食品又は飲料に、細胞にウイルス抵抗を誘導する機能を有し、且つウイルス感染細胞を選択的に死滅させる機能を有する化合物、例えばシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される1以上の化合物の有効量が含有されていれば良い。

本発明の抗ウイルス用食品又は抗ウイルス用飲料としては、細胞にウイルス抵抗を誘導する機能を有し、且つウイルス感染細胞を選択的に死滅させる機能を有する化合物、例えばシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される1以上の化合物が含有、添加及び／又は希釈されていれば特にその形状に限定は無く、タブレット状、顆粒状、カプセル状、ゲル状、ゾル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

また肝機能改善用、熱ショックタンパク誘導用、発がん予防用食品又は肝機能改善用、熱ショックタンパク誘導用、発がん予防用飲料としては肝機能改善作用、熱ショックタンパク誘導作用、発がん予防作用を有するシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される1以上の化合物が含有、添加及び／又は希釈されていれば特にその形状に限定は無く、タブレット状、顆粒状、カプセル状、ゲル状、ゾル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

。

本発明の食品又は飲料は生理活性を有するシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を含有し、これらの化合物の有する種々の生理活性、抗ウイルス作用、肝機能改善作用、熱ショックタンパク誘導作用、発がん予防作用等によって、これらを摂取することによりウイルス性疾患予防、治療、肝機能改善効果、発がん予防効果等を有する健康食品又は飲料であり、生体の恒常性の維持に有用な食品又は飲料である。

本発明で使用する化合物はその生理活性の有効量の投与を行っても毒性は認められず、例えば経口投与の場合シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそ

これらの塩のいずれかを 100 mg/kg でラットに単回投与しても死亡例は認められない。

以上、本発明の薬剤はウイルス性疾患、肝疾患、がん等の治療剤又は予防剤として用いることができ、特にHIV が惹起する後天性免疫不全症候群の治療、症状改善に有用である。

実施例

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。なお、実施例における%は重量%を意味する。

参考例 1

10 g のD-グルクロン酸（シグマ社製 G 5269）を1リットルの水に溶解し、 121°C で4時間加熱した後約 10 ml になるまで減圧下濃縮した。これに酢酸ブチル：酢酸：水 = 3 : 2 : 2 混合液の上層 40 ml を加えて混合後、遠心によって得た上清を減圧下約 10 ml まで濃縮した。

上記抽出液をカラムクロマトグラフィー用シリカゲルBW-300SP（ $2 \times 28\text{ cm}$ 、富士シリシア化学社製）にアプライし、酢酸ブチル：酢酸：水 = 3 : 2 : 2 の上層を溶離液としてコンプレッサーで 0.2 kg/cm^2 に加圧し、毎分 5 ml の流速で分離を行った。1画分当り 10 ml になるようにフラクショネーションを行い、各画分の一部をとって薄層クロマトグラフィーで分析したところ61番から80番までの画分に高純度のシクロペンテノンが含まれていた。これらの画分を集めて減圧下濃縮した後 40 ml のクロロホルムで抽出し、抽出液を減圧下濃縮することによって 100 mg のシクロペンテノンを得た。

この画分をパルパックタイプSカラムを用いた順相HPLCで分離し、 215 nm の紫外線吸収で検出したところ、純度は98%であった。

上記シクロペンテノン 113.9 mg をエタノール 2.85 ml に溶かした。このエタノール溶液にヘキサン／エタノール（94/6） 3.85 ml を更に加え、 17 mg/ml のシクロペンテノン溶液を調製した。この液を $0.5\text{ }\mu\text{m}$ のフィルターでろ過し、光学分割 HPLC 試料溶液とした。

この試料溶液を以下の条件で光学分割 HPLC を行い、前ピークの (−) 体シクロペンテノン及び後ピークの (+) 体シクロペンテノンのフラクションをそれぞれ集め、減圧乾固し、(−) 体シクロペンテノン 43.2 mg、(+) 体シクロペンテノン 43.0 mg をそれぞれ得た。

光学分割 HPLC 条件

カラム：キラルパック AS (ダイセル化学工業) 2.0 cm× 25.0 cm

カラム温度：40℃

移動相：ヘキサン/エタノール (94/6)

流速：14.0 ml/min

検出：UV 210 nm

試料注入量：150 μ l (2.55 mg)

得られた (−) 体シクロペンテノン及び (+) 体シクロペンテノンは両者共に約 1 % のエナンチオマーを含有していたため再度上記の条件で光学分割した。その結果、前ピークの (−) 体シクロペンテノン 30.0 mg から 19.7 mg のエナンチオマーを含有しない (−) 体シクロペンテノンを、後ピークの (+) 体シクロペンテノン 37.4 mg から 27.7 mg のエナンチオマーを含有しない (+) 体シクロペンテノンをそれぞれ得た。なお (−) 体シクロペンテノン、(+) 体シクロペンテノンの光学分割 HPLC の溶出時間はそれぞれ 33 分、40 分であった。

実施例 1

(1) 2×10^5 cells/ml のヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 (ATCC CCL-240) を含む 10 % 牛胎児血清含有 RPMI1640 培地 5ml を 6 穴プレートの各ウェルに入れ、37℃ 5 % CO₂ 存在下で 24 時間培養した後、最終濃度が、0、10、20、30、40、50、100 μ M になるように参考例 1 記載のシクロペンテノンを添加し、更に 8 時間培養を続けた。

培養終了後、細胞数を計測した後、細胞を遠心分離で回収し、リン酸緩衝食塩水 (PBS) で洗浄して、シクロペンテノン処理細胞を調製した。また、45℃ 10 分間熱処理を行った後、同様に培養した細胞も調製した。

これらの処理細胞を用い、モレキュラー クローニング (Molecular Cloning) [コールド スプリング ハーバー ラボラトリー プレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press) (1989)] 記載の方法に従って SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。処理細胞は、 2.5×10^6 cells/ml になるように SDS-PAGE Sample buffer に懸濁し、この細胞懸濁液を 100°C で 10 分間処理した後、 $5\mu\text{l}$ ずつを 2 枚の SDS-PAGE ゲル (5% スタッキングゲル、10% セパレーションゲル) にアプライし、電気泳動を行った。一方のゲルは、クマシー染色し、他方のゲルは、Polyvinylidene difluoride transfer membrane [ImmobilonTM : ミリポア (MILLIPORE) 社製 Cat.# IPVH000-10] にブロッティングした。このメンブレンを Block Ace (大日本製薬株式会社 Cat.# UK-B25) で 4°C 一晩ブロッキングした。

このブロッキングしたメンブレンに熱誘導される 70 kDa の熱ショックタンパクと特異的に反応するモノクローナル抗体 HSP 72/73 (Ab-1) [オンコジーン リサーチ プロダクツ (Oncogene Research Products) 社製 Cat.# HSP01] を反応させた後、0.05% Tween 20 を含むトリス緩衝食塩水 (TBS) で洗浄し、更に、TBS で洗浄した。次いで、Peroxidase 複合二次抗体 HRP-Rabbit Anti Mouse IgG (H+L) [ZYMED ラボラトリース社 (ZYMED Laboratories, Inc.) 製 Cat.# 61-6520] を反応させ、先の操作と同様に洗浄した。このように一次抗体、二次抗体と反応させたメンブレンに、ケミルミノール試薬 RENAISSANCETM [デュポン NEN (Dupont NEN) 社製 Cat.# NEL-100] を反応させた後、X-Ray フィルムを感光して 70 kDa の熱ショックタンパクの誘導を確認した。

その結果、20 から 30 μM のシクロペンテノンの添加で、 45°C 10 分間熱処理と同程度の 70 kDa の熱ショックタンパクの誘導が確認された。その誘導の強弱は表 1 に示した。なお表 1 中、+ は誘導の強さを表し、+ が多いほど誘導が強いことを意味する。また - は誘導が認められなかったこと、± は誘導がわずかであることを意味する。

表 1

処理細胞	熱ショックタンパク誘導
45℃10分間熱処理	+++
0 μ M シクロペンテノン	—
10 μ M シクロペンテノン	+
20 μ M シクロペンテノン	+++
30 μ M シクロペンテノン	+++
40 μ M シクロペンテノン	++
50 μ M シクロペンテノン	+
100 μ M シクロペンテノン	±

また (—) 体シクロペンテノン、(+) 体シクロペンテノンについても同様の結果を得た。

実施例 2

(1) HeLa 細胞 (ATCC CCL-2) を 10 cm プレート中、10% 牛胎児血清含有ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM; 日水社製) で 80% コンフルエントになるまで 5% 炭酸ガス存在下、37℃ で培養した後、終濃度が 0、5、10、20、又は 40 μ M になるようにシクロペンテノンを添加し、上記条件で更に 6 時間培養を続けた。培地を捨て、各ウェルに 1 ml の 10% トリクロロ酢酸を加えた後、スクレーパーで細胞を回収した。

こうして得られた細胞の SDS-PAGE とブロッティングを実施例 1 の方法で行い、70 kD 熱ショックタンパクの発現を検出した。

その結果、5 μ M ~ 40 μ M シクロペンテノン添加区分で 70 kD 熱ショックタンパクの誘導が見られた。その結果を表 2 に示す。なお、表 2 中、+ はブロッティングによって観察された 70 kD 熱ショックタンパクのシグナルの強さを表し、+ が多いほどシグナルが強いことを意味する。また、± はシグナルが非常に

弱いことを意味する。

表 2

処理細胞	70 k d 熱ショックタンパク量
0 μ M シクロペンテノン	±
5 μ M シクロペンテノン	+
10 μ M シクロペンテノン	++
20 μ M シクロペンテノン	+++
40 μ M シクロペンテノン	+++

(2) HeLa 細胞を 10 cm プレート中、10% 牛胎児血清含有 DMEM で 80% コンフルエントになるまで 5% 炭酸ガス存在下、37℃ で培養した後、終濃度が 0、5、10、20、又は 40 μ M になるようにシクロペンテノンを添加し、上記条件で更に 6 時間培養を続けた。この後、5% 牛胎児血清含有 DMEM で細胞を洗浄し、アデノウイルスである Ad5 dlX [サイトウ (Saito) ら、ジャーナル オブ ビロロジー、第 54 巻、第 711~719 頁 (1985)] を含む 5% 牛胎児血清含有 DMEM を細胞に加えて感染させ、20 時間培養した。但し、感染多重度 (m. o. i.) を 50 に設定した。培地を捨て、各ウェルに 1 ml の 10% トリクロロ酢酸を加えた後、スクレーパーで細胞を回収した。

こうして得られた細胞の SDS-PAGE とブロッティングを実施例 1 の方法で行い、アデノウイルスのヘキソンタンパクの発現を検出した。但し、一次抗体は抗アデノウイルスヘキソン抗体 [ケミコン インターナショナル社 (Chemicon International Inc.) 製、AB1056] を用いた。

10 μ M 以上のシクロペンテノンを添加した区分ではシクロペンテノン非添加の対照に比べて明らかにヘキソンタンパク量が減少していた。また、20 μ M 以下のシクロペンテノン添加区分ではシクロペンテノン非添加区分と同様の細胞増

殖が見られた。

(3) 実施例 2 - (2) と同様にシクロペンテノン処理の後でアデノウイルスを感染させて培養した H e L a 細胞から「ウイルス実験プロトコール」(メジカルビュー社発行) 24 ~ 25 頁記載の方法に従ってウイルス DNA を抽出した。

すなわち、ウイルス感染細胞をリン酸緩衝食塩水で洗浄し、1 ml の 0.6% ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) / 10 mM EDTA 水溶液に懸濁した後、3.0 ml の 5 M NaCl 水溶液を添加した。0℃で1時間放置し、遠心により得た上清に 3 ml のエタノールを加えて混合した。遠心によって得た沈殿を 0.2 ml の TE 緩衝液 [10 mM トリス (Tris) - HCl pH 8.0、1 mM EDTA] に溶解し、2 μ l の 10% SDS と 4 μ l の 10 mg / ml プロティナーゼ K (宝酒造社製) を加えて 37℃で1時間保温した。フェノールとクロロホルムの等量混合液で2回抽出し、水層に 20 μ l の 3 M 酢酸ナトリウムと 400 μ l のエタノールを加えて遠心し、沈殿を 50 μ l の TE 緩衝液に溶解して DNA 溶液を得た。10 μ l の DNA 溶液に 10 単位の EcoT22I (宝酒造社製) と 1 μ l の 10 mg / ml リボヌクレアーゼ A を加えて消化し、アガロースゲル電気泳動を行ってウイルス DNA 量を測定した。その結果、5 μ M 以上のシクロペンテノンを添加した区分ではシクロペンテノン非添加の対照に比べて明らかにウイルス DNA 量が減少していた。

(4) 実施例 2 - (2) と同様に H e L a 細胞を培養した後、シクロペンテノンを添加せずに、5 型アデノウイルス (Adenoid 75 ATCC VR-5) を含む 5% 牛胎児血清含有 DMEM を細胞に加えて感染させた。但し、感染多重度 (m. o. i.) を 50 に設定した。その後、終濃度が 0、5、10、20、又は 40 μ M になるようにシクロペンテノンを添加し、20 時間培養した。培養後は、実施例 2 - (2) と同様にアデノウイルスのヘキソタンパクの検出を行った。その結果、10 μ M 以上のシクロペンテノンを添加した区分ではシクロペンテノン非添加の対照に比べて明らかにヘキソタンパク量が減少していた。また、20 μ M 以下のシクロペンテノン添加区分ではシクロペンテノン非添加区分と同様の細胞増殖が見られた。

(5) 実施例 2 - (2) と同様に H e L a 細胞を培養し、シクロペンテノンで処理した。その後、実施例 2 - (4) と同様に、5 型アデノウイルス (Adenoid 75 ATCC VR-5) を感染させ、シクロペンテノンを添加した培地で培養した。培養後は、実施例 2 - (2) と同様にアデノウイルスのヘキソタンパクの検出を行った。その結果、10 μ M 以上のシクロペンテノンを添加した区分ではシクロペンテノン非添加の対照に比べて明らかにヘキソタンパク量が減少していた。また、20 μ M 以下のシクロペンテノン添加区分ではシクロペンテノン非添加区分と同様の細胞増殖が見られた。

(6) 実施例 2 - (5) と同様にシクロペンテノン処理の後で 5 型アデノウイルス (Adenoid 75 ATCC VR-5) を感染させて培養した H e L a 細胞から実施例 2 - (3) と同様の方法でウイルス DNA 量を測定した。その結果、5 μ M 以上のシクロペンテノンを添加した区分ではシクロペンテノン非添加の対照に比べて明らかにウイルス DNA 量が減少していた。

以上、実施例 2 - (2) ~ (6) の結果から、シクロペンテノンは感染前、感染後、あるいは感染前後の投与により、アデノウイルスに対して抗ウイルス活性をもつことが明らかになった。また (-) 体シクロペンテノン、(+) 体シクロペンテノンについても同様の結果を得た。

実施例 3

(1) プロシーディングズ オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.)、第 84 巻、第 156 ~ 160 頁 (1987) に記載の、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子をレポーター遺伝子として持つ組換えレトロウイルスベクター BAG を、制限酵素 BamHI で消化し、セルフライゲーションさせることによって β -ガラクトシダーゼ遺伝子を抜き取った DOL ベクターを構築した。

(2) 実施例 3 - (1) 記載の DOL ベクタープラスミドを大腸菌 (E. coli) H B 101 に形質転換し、L-ブロス培地で培養し、集めた菌体よりプラスミドを抽出し、塩化セシウム密度勾配超遠心にて DOL プラスミドを精製した。

精製した DOL プラスミド 10 μ g を組換えレトロウイルスパッケージング細胞

ΨCRIP [プロシーディングズ オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ U S A、第 8 5 巻、第 6460 ~ 6464 頁 (1988)] にカチオニックリポソーム [Trans 2 T LT-1 (宝酒造社)] を用いて導入した。

導入した細胞を 37℃、5% CO₂ 条件下、G418 (ギブコ社) を 0.4 mg/ml 含む 10% 仔ウシ血清含ダルベッコ改変イーグル培地で 2 週間選択し、得られたコロニーを 20 個クローニングし、直径 100 mm プレートで増やし、セミコンフルエントの状態では培地を交換し、24 時間後に上清を回収して 0.45 μm フィルター (Milex HV ; ミリポア社) でろ過し、ウイルス上清とした。また細胞はトリプシンではがし、液体窒素中で保存した。

各コロニーより得たウイルス上清の力価は下記の実施例 3 - (3) に示す方法で測定し、最も力価の高いウイルス液が得られたクローンを組換えレトロウイルスプロデューサー細胞 ΨCRIP/DOL として樹立した。樹立時のプロデューサー細胞から得たウイルス上清の力価は 1×10^6 コロニー形成ユニット (cfu) /ml であった。樹立したプロデューサー細胞は G418 を 0.2 mg/ml 含む 10% 仔ウシ血清含ダルベッコ改変イーグル培地で維持した。

(3) ウイルス力価の測定には NIH3T3 細胞 (ATCC CRL-1658) を用いた。10% 仔ウシ血清含ダルベッコ改変イーグル培地で培養した NIH3T3 細胞を 6 ウェルプレート (岩城硝子社) に 50000 個/ウェルで植え継ぎ、翌日、8 μg/ml のポリブレン (シグマ社) を含む 1ml のウイルス希釈液で NIH3T3 細胞に 3 時間感染させた。ウイルスの希釈には 10% 仔ウシ血清含ダルベッコ改変イーグル培地を用いた。感染終了後、ポリブレンを希釈するために、更に 2 ml の 10% 仔ウシ血清含ダルベッコ改変イーグル培地を添加した。翌日より G418 を 0.4 mg/ml 含む 10% 仔ウシ血清含ダルベッコ改変イーグル培地に交換し、3 ~ 4 日ごとに培地を交換しながら、2 週間選択を行い、コロニーを形成させた。得られたコロニーをギムザ染色液 (ギブコ社) にて、常法に従い染色し計数した。得られたコロニー数に希釈倍率を乗じた値を、cfu としてウイルス力価とした。

(4) 実施例 3 - (2) 記載の組換えレトロウイルスプロデューサー細胞 ΨCRIP/DOL を 6 ウェルプレートに植え継ぎ、セミコンフルエントの状態になったと

きにシクロペンテノン $0 \sim 20 \mu\text{M}$ 含む 10% 仔ウシ血清含ダルベッコ改変イーグル培地 1.5ml に交換し、24時間後に上清を回収した。回収した上清のウイルス力価を実施例2-(3)記載の方法で測定し、シクロペンテノンの添加による組換えレトロウイルスプロデューサー細胞のウイルス産生能への影響を検討した。

シクロペンテノンを添加していない対照実験区より得たウイルス液の力価は $9.5 \times 10^4 \text{ cfu / ml}$ であったのに対し、 0.1 、 0.5 、 1.0 、 2.0 、 5.0 、 10 、 $20 \mu\text{M}$ のシクロペンテノン存在下でのウイルス液の力価はそれぞれ 8.3×10^4 、 6.4×10^4 、 6.1×10^4 、 3.8×10^4 、 5.6×10^4 、 5.1×10^4 、 $4.1 \times 10^4 \text{ cfu / ml}$ であり、シクロペンテノンの添加によりプロデューサー細胞から得られるウイルス液の力価の低下が確認された。すなわちシクロペンテノンによる組換えレトロウイルスプロデューサー細胞のウイルス産生能の抑制作用が認められた。

(5) G418耐性遺伝子を発現するコントロールプラスミドpcD2-Y [Mol. Cell. Biol. 第7巻、第2745～2752頁(1987)]、およびHPV16型E7とG418耐性遺伝子の両方を発現できるプラスミドpcD2-16E7 [Jpn. J. Cancer Res. 第82巻、第1340～1343頁(1991)]を大腸菌E. coli HB101に形質転換し、L-ブロス培地で培養し、集めた菌体よりプラスミドを抽出し、塩化セシウム密度勾配超遠心にて精製し、遺伝子導入用ベクタープラスミドとした。

NIH3T3細胞は 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下、 10% 仔ウシ血清含ダルベッコ改変イーグル培地中にて培養した。

精製したプラスミド $10 \mu\text{g}$ をNIH3T3細胞にカチオニックリポソーム(TransIT LT-1, 宝酒造社製)を用いて導入し、細胞を 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下、G418(GIBCO)を 0.4 mg / ml 含む 10% 仔ウシ血清含ダルベッコ改変イーグル培地で2週間選択し、得られたコロニーをクローニングし、 $\phi 100 \text{ mm}$ の組織培養プレートにまで増やし、順次、液体窒素で保存した。

これにより、コントロールベクターを導入したNIH3T3細胞、及びHPV16型E7によってがん化させたNIH3T3細胞をそれぞれ9株ずつ樹立した。

コントロールベクターを導入した細胞株をNIH3T3/Y-1、NIH3T3/Y-2、NIH3T3/Y

-3、NIH3T3/Y-4、NIH3T3/Y-5、NIH3T3/Y-6、NIH3T3/Y-7、NIH3T3/Y-8およびNIH3T3/Y-9とした。

E7を導入した細胞株をNIH3T3/E7-1、NIH3T3/E7-2、NIH3T3/E7-3、NIH3T3/E7-4、NIH3T3/E7-5、NIH3T3/E7-6、NIH3T3/E7-7、NIH3T3/E7-8およびNIH3T3/E7-9とした。

(6) NIH3T3細胞、コントロールベクターを導入した細胞株、およびE7を導入した細胞株を100mmの組織培養プレートにて10%仔ウシ血清含ダルベッコ改変イーグル培地で50～70%コンフルエントにまで増やし、PBSで洗浄後、0.25%トリプシン-EDTA溶液で細胞を剥がし、10%仔ウシ血清含ダルベッコ改変イーグル培地5mlに懸濁した。

懸濁液の一部をとり、ノイバウエル型血球計算板にて細胞密度を計算した。得られた数字を元に10%仔ウシ血清含ダルベッコ改変イーグル培地にて希釈し、直径60mmの組織培養プレートに200細胞/プレートになるように播き、3mlの培地中で培養を開始した。培養開始から24時間後、シクロペンテノン⁵を5μMになるように添加した。さらに24時間後、新しい培地と交換しシクロペンテノンを5μMになるように添加した。

以後は2～3日毎に培地を交換しシクロペンテノンを5μMになるように添加した。対照実験区として、シクロペンテノンを添加しないプレートを用意し、同じように培地交換した。培養はそれぞれ3本立てで行った。9日間培養後、メタノールで固定してギムザ液(GIBCO)でコロニーを染色した。

なおNIH3T3、NIH3T3/Y-1およびNIH3T3/E7-2を用いて評価した。

染色したコロニーを計数した結果を表3に示す。E7を導入した細胞は、コントロール細胞に比べてシクロペンテノンへの感受性が高く、シクロペンテノンはがん遺伝子形質転換細胞を選択的に作用した。

表 3

細胞	コロニー数 (平均±SD)	
	対照	シクロペンテノン処理
NIH3T3	91.7±11.9	85.3± 4.0
NIH3T3/Y-1	83.3± 8.4	71.3± 2.3
NIH3T3/E7-2	67.3± 3.2	22.3± 3.5

実施例 3 - (5) の他の細胞株を使用した場合も、同様の結果を得た。また (一) 体シクロペンテノン、(+) 体シクロペンテノンでも同様の結果を得た。

実施例 4

(1) 24穴マイクロプレート中で10%牛胎児血清含有Eagle-MEMを用い単層になるまで5%炭酸ガス存在下、37℃で培養したMDCK細胞(大阪府立公衆衛生研究所保存株)に終濃度が0、5、10、20、又は40 μ Mになるようにシクロペンテノンを添加し、上記条件で更に6時間培養を続けた。

この後、PBSで細胞を洗浄し、インフルエンザウイルスA/PR/8/34株(大阪府立公衆衛生研究所保存株)を細胞に加えて感染させ、30分間、37℃でインキュベートした。但し、感染多重度(m. o. i.)を0.01に設定した。インキュベート後、細胞をPBSで洗浄し、10 μ g/mlトリプシンを含んだEagle-MEMで培養した。

感染細胞上清を0、1、2、3日後に採取し、ウイルスのタイターをPAP法によるフォーカス計数法[J. Clin. Microbiol. 第28巻、第1308~1313頁(1990)]で求めた。

その結果、10 μ M以上のシクロペンテノンを添加した区分ではシクロペンテノン非添加の対照に比べて明らかにウイルスのタイターが低下していた。その結

果を表4に示す。また各シクロペンテノン添加区分でも、細胞ははがれることなく接着していた。

表4

感染後の日数	シクロペンテノン濃度 (μM)				
	0	5	10	20	40
	pfu/ml	pfu/ml	pfu/ml	pfu/ml	pfu/ml
0	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
1	3.6×10^5	4.0×10^5	2.0×10^5	2.2×10^3	4.0×10^2
2	1.0×10^6	8.0×10^5	7.2×10^5	2.6×10^5	1.9×10^5
3	1.5×10^5	9.6×10^4	2.4×10^5	3.8×10^5	5.6×10^5

(2) 実施例4-(1)と同様の手順でシクロペンテノン非存在下、単層に培養したMDCK細胞に実施例4-(1)と同様にインフルエンザウイルスを細胞に加えて感染させ、終濃度が0、5、10、20、又は40 μM になるようにシクロペンテノンを添加した10 $\mu\text{g/ml}$ トリプシンを含んだEagle-MEMで培養した。その後、実施例4-(1)と同様に、ウイルスのタイターを求めた。その結果、10 μM 以上のシクロペンテノンを添加した区分ではシクロペンテノン非添加の対照に比べて明らかにウイルスのタイターが低下していた。その結果を表5に示す。また、各シクロペンテノン添加区分で、細胞ははがれることなく接着していた。

表 5

感染後の日数	シクロペンテノン濃度 (μ M)				
	0	5	10	20	40
	pfu/ml	pfu/ml	pfu/ml	pfu/ml	pfu/ml
0	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
1	4.2×10^6	2.4×10^5	1.9×10^5	1.2×10^5	$<1.0 \times 10^2$
2	1.6×10^6	1.5×10^5	3.4×10^5	1.0×10^6	$<1.0 \times 10^2$
3	4.8×10^5	1.9×10^5	1.7×10^5	7.2×10^5	$<1.0 \times 10^2$

(3) 実施例 4-(1)と同様の手順で単層に培養し、終濃度が0、20、又は40 μ Mのシクロペンテノンで6時間処理したMDCK細胞に、実施例 4-(1)と同様にインフルエンザウイルスを感染させ、感染前と同濃度のシクロペンテノンを含む10 μ g/mlトリプシン含有Eagle-MEM培地で培養を続けた。その後、実施例 4-(1)と同様に、ウイルスのタイターを求めた。その結果、20 μ M以上のシクロペンテノンを添加した区分ではシクロペンテノン非添加の対照に比べて明らかにウイルスのタイターが低下していた。その結果を表 6 に示す。また各のシクロペンテノン添加区分でも、細胞ははがれることなく接着していた。

表 6

感染後の日数	シクロペンテノン濃度 (μ M)		
	0	20	40
	pfu/ml	pfu/ml	pfu/ml
0	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
1	4.6×10^5	9.8×10^4	$<1.0 \times 10^2$
2	6.6×10^5	1.6×10^5	$<1.0 \times 10^2$
3	1.0×10^5	1.3×10^5	$<1.0 \times 10^2$

(4) 実施例 4 - (1) と同様の実験を感染多重度 (m. o. i.) を 0.001 に設定して行った。その結果、 10μ M 以上のシクロペンテノンを添加した区分ではシクロペンテノン非添加の対照に比べて明らかにウイルスのタイターが低下していた。その結果を表 7 に示す。また、各シクロペンテノン添加区分でも、細胞ははがれることなく接着していた。

表 7

感染後の日数	シクロペンテノン濃度 (μ M)				
	0	5	10	20	40
	pfu/ml	pfu/ml	pfu/ml	pfu/ml	pfu/ml
0	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
1	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
2	3.6×10^5	5.2×10^5	6.2×10^5	5.0×10^5	4.4×10^3
3	3.8×10^4	4.0×10^4	8.6×10^4	1.1×10^5	8.0×10^3

(5) 実施例 4 - (2) と同様の実験を感染多重度 (m. o. i.) を 0.001 に設定して行った。その結果、10 μ M 以上のシクロペンテノンを添加した区分ではシクロペンテノン非添加の対照に比べて明らかにウイルスのタイターが低下していた。その結果を表 8 に示す。また各シクロペンテノン添加区分でも、細胞ははがれることなく接着していた。

表 8

感染後の日数	シクロペンテノン濃度 (μ M)				
	0	5	10	20	40
	pfu/ml	pfu/ml	pfu/ml	pfu/ml	pfu/ml
0	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
1	6.0×10^2	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
2	3.6×10^5	8.8×10^4	2.0×10^5	1.8×10^4	$<1.0 \times 10^2$
3	3.8×10^4	2.6×10^4	1.8×10^4	1.2×10^4	$<1.0 \times 10^2$

(6) 実施例 4 - (3) と同様の実験を感染多重度 (m. o. i.) を 0.001 に設定して行った。その結果、10 μ M 以上のシクロペンテノンを添加した区分ではシクロペンテノン非添加の対照に比べて明らかにウイルスのタイターが低下していた。その結果を表 9 に示す。また各シクロペンテノン添加区分でも、細胞ははがれることなく接着していた。

表 9

感染後の日数	シクロペンテノン濃度 (μ M)				
	0	5	10	20	40
	pfu/ml	pfu/ml	pfu/ml	pfu/ml	pfu/ml
0	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
1	6.0×10^3	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
2	6.2×10^5	4.4×10^5	4.8×10^5	3.2×10^4	$<1.0 \times 10^2$
3	3.6×10^4	5.6×10^4	2.8×10^4	2.8×10^4	$<1.0 \times 10^2$

以上、実施例4-(1)～(6)の結果から、シクロペンテノンはインフルエンザウイルスに対して抗ウイルス活性をもつことが明らかになった。また(－)体シクロペンテノン、(＋)体シクロペンテノンでも同様の結果を得た。

実施例5

(1) ヒトT細胞に対するシクロペンテノンの作用

2×10^5 個/mlのCEM-SS細胞(ATCC CCL-119)又はH9細胞(ATCC HTB-176)に0.5～5 μ Mシクロペンテノンを添加して3日間培養し、生細胞数と死細胞数を計数して細胞生存率を算出した。

その結果、どちらの細胞においてもシクロペンテノン添加による細胞生存率の顕著な減少は見られなかった。その結果を図1と図2に示す。すなわち、図1と図2は添加したシクロペンテノン濃度と細胞生存率の関係を示す図であり、横軸は添加したシクロペンテノン濃度(μ M)、縦軸は3日間培養後の細胞生存率(%)を示す。図1はCEM-SS細胞を用いた場合の結果であり、図2はH9細胞

胞を用いた場合の結果である。

(2) HIV感染T細胞に対するシクロペンテノンの作用

HIV-1_{IIIB}に感染したCEM-SS細胞(CEM-3Bと略称する)又はHIV-1_{IIIB}に感染したH9細胞(H9-3Bと略称する)に1~5 μ Mシクロペンテノンを添加して3日間培養した。両細胞の90%以上がHIV-1_{IIIB}に感染している。生細胞数と死細胞数を計数して細胞生存率を算出した。

その結果、どちらの細胞においても3 μ Mシクロペンテノン添加によって細胞生存率が顕著に減少し、5 μ Mシクロペンテノン添加では更に細胞生存率が低下した。すなわち実施例5-(1)と比較し、シクロペンテノンは抗HIV作用を示した。その結果を図3と図4に示す。すなわち、図3と図4は添加したシクロペンテノン濃度と細胞生存率の関係を示す図であり、横軸は添加したシクロペンテノン濃度(μ M)、縦軸は3日間培養後の細胞生存率(%)を示す。図3はCEM-3Bを用いた場合の結果であり、図4はH9-3Bを用いた場合の結果である。

実施例6

実施例5-(2)の3日間培養した後の培養上清中に含まれるp24抗原の濃度を測定した。その結果、添加したシクロペンテノン濃度に応じてp24濃度が減少し、抗HIV作用が認められた。その結果を表10に示す。但し、表10において括弧内の数字はシクロペンテノン非添加時のそれぞれの細胞培養上清のp24濃度に対する比を%で表したものである。

表 10

シクロペンテノン濃度 (μ M)	培養上清中の p 24 濃度 (ng/ml)	
	CEM-3B	H9-3B
0	280 (100%)	210 (100%)
1	232 (83%)	203 (97%)
3	176 (63%)	157 (75%)
5	175 (63%)	148 (70%)

実施例 7

Vero細胞(ATCC CCL-81)を10%牛胎児血清含有Eagle-MEMに 5×10^4 cells/100 μ lの細胞濃度になるように懸濁し、96穴マイクロタイタープレートに1穴当たり100 μ lの細胞懸濁液を入れ、5%炭酸ガス存在下、37℃で一晩培養し、単層となったVero細胞を調製した。

この細胞に、終濃度が0、5、10、20、又は40 μ Mになるようにシクロペンテノンを添加したEagle-MEM培地を添加して5%炭酸ガス存在下、37℃で7時間培養した。

培養終了後、培地を除去し、PBSで2回洗浄後、日本脳炎ウイルス(JEV Ja0 Ar-363-70株)を 4.9×10^2 pfu/mlになるように接種し、5%炭酸ガス存在下、37℃で30時間培養した後、細胞をエタノール固定し、PAP法によるフォーカス計数法[Arch. Virol. 第86巻、第129～135頁(1985)]でフォーカス計数を行った。

その結果、40 μ Mのシクロペンテノンを添加した区分ではシクロペンテノン非添加の対照に比べて明らかにフォーカスの数が低下していた。その結果を表11に示す。また各シクロペンテノン添加区分で、細胞ははがれることなく接着していた。

表 11

シクロペンテノン濃度 (μM)	pfu / ml
0	3.0×10^7
10	1.6×10^7
20	2.1×10^7
40	4.9×10^6

(2) 24穴マイクロプレート中で10%牛胎児血清含有Eagle-MEMを用い単層になるまで5%炭酸ガス存在下、37℃で培養したVero細胞をPBSで洗浄し、 4.9×10^2 pfu / ml の日本脳炎ウイルス (JEV Ja0Ar-363-70株) を細胞に加えて感染させ、90分間、37℃でインキュベートした。

インキュベート後、細胞をPBSで洗浄し、終濃度が0、5、10、20、又は40 μM になるようにシクロペンテノンを添加したMEMで培養した。

感染細胞上清を0、1、2、3日後に採取し、ウイルスのタイターをVero細胞を用いたPAP法によるフォーカス計数法 [J. Clin. Microbiol. 第28巻、第1308～1313頁 (1990)] で求めた。

その結果、10 μM 以上のシクロペンテノンを添加した区分ではシクロペンテノン非添加の対照に比べて明らかにウイルスのタイターが低下していた。その結果を表12に示す。また各シクロペンテノン添加区分で、細胞ははがれることなく接着していた。

表 1 2

シクロペンテノン濃度 (μ M)	ウイルス接種後の日数		
	1 日	2 日	3 日
	pfu / ml	pfu / ml	pfu / ml
0	6.0×10^3	5.6×10^6	1.1×10^7
1 0	6.0×10^3	2.4×10^6	4.4×10^6
2 0	6.4×10^3	1.9×10^6	3.0×10^6
4 0	0	0	0

上記実施例 7 - (1)、(2) の結果から、シクロペンテノンは日本脳炎ウイルスに対して抗ウイルス活性をもつことが明らかになった。さらに、日本脳炎ウイルスは、C型肝炎ウイルスと同系の種であり、C型肝炎ウイルスのin vitroでの培養が確立していない現在ではC型肝炎ウイルスのモデルとして日本脳炎ウイルスが利用されている。これらのことより、シクロペンテノンはC型肝炎の治療薬としても有効である。

また (-) 体シクロペンテノン、(+) 体シクロペンテノンについても同様の結果を得た。

実施例 8

5 年前に C型肝炎ウイルス感染症と診断され、インターフェロン、強力ミノプラーゲンによる治療を受けてきたが、GOT、GPTともに150前後と肝機能の改善が見られなかった女性が、後記実施例 13 で得られた飲料を毎日 50 ml (シクロペンテノン 2 mg 含有)、2 カ月飲用した結果、GOT、GPTともに

80と改善した。更に同様に1カ月飲用を続けた結果、GOT、GPTともに30と顕著な肝機能の改善が見られた。

実施例9

ICR系マウス（日本エスエルシーより購入、7週令、雌性）の背部の毛を剃った後、イニシエーターとしてDMBA（dimethylbenzanthracene）を50 μ g/マウスとなるように、そのアセトン溶液を塗布し、その1週間後より、プロモーターとしてTPA（12-o-Tetradecanoylphorbol 13-acetate）を1 μ g/マウスとなるように、そのアセトン溶液をイニシエーター塗布部に、毎週2回試験終了まで塗布し、シクロペンテノンの80%エタノール溶液又は対照の80%エタノール溶液を各TPA塗布の1時間前に塗布し、2段階皮膚発がんにおける発がん抑制作用を20週間観察した。

対照群（vehicle塗布群）は15週以降は100%（12匹中12匹）の発がん率を示したのに対し、シクロペンテノンは強力に発がんを抑制し、2.5mg/マウスは15週以降に8.3%（12匹中1匹）、19週以降に25%（12匹中3匹）の発がん率という発がん抑制を示した。結果を図5に示す。すなわち図5はシクロペンテノンの発がん抑制作用を示す図であり、縦軸は発がん率、横軸は時間（週）を示す。図中白三角はシクロペンテノン2.5mg/マウス処理群（12匹）、黒三角はシクロペンテノン0.8mg/マウス処理群（11匹）、白丸は対照群（12匹）を示す。

なおマウス耳介におけるTPA炎症試験においてシクロペンテノンは2.5mg/マウスのマウス耳介塗布において抗炎症活性を示さなかった。

以上シクロペンテノンは2段階化学発がんにおいて抗プロモーター作用を示した。シクロペンテノンを含むグルクロン酸の加熱処理物、（-）体シクロペンテノン、（+）体シクロペンテノンも同様の結果を示した。

実施例10

注射剤

（1）生理食塩液（日本薬局方収載品）にシクロペンテノンを1%濃度で加え注射剤を作製した。

(2) 生理食塩水（前記と同じ）に（－）体シクロペンテノン及びグリシルリチン酸をそれぞれ0.5%及び0.1%濃度で加え、注射剤を作製した。

実施例 1 1

錠剤

(1) シクロペンテノン10mgと微結晶性セルロースの適量とを含有する錠剤を調製し、糖衣を施し、錠剤を作製した。

(2) (+)体シクロペンテノン0.1mg、グリシルリチン酸ジカリウム10mg及び微結晶セルロースの適量を含有する錠剤を調製し、糖衣を施し、錠剤を作製した。

実施例 1 2

軟膏

シクロペンテノン 1 g

吸水軟膏（日本薬局方収載） 99 g

シクロペンテノンをまず少量の吸水軟膏と十分に練り合せ、次いで残った吸水軟膏を徐々に加えて均一になるまで練り合せて軟膏を作製した。

この軟膏は1日4～5回患部に塗布される。

実施例 1 3

(1) ペクチン（ポモシンペクチンLM-13CG：ハーキュリーズ社製）5kgを水道水100リットルに添加し、液温28℃から液温120℃となるまで水蒸気吹き込みにより35分間昇温させ、次いでかくはん下で120℃、5時間保温し、次いで冷却し、冷却物135リットルを調製した。次いで冷却物にろ過助剤として、セライト#545（セライト社製）1.35kg、及びシリカ#600-S（中央シリカ社製）1.35kgを添加し、次いでセライト#545の0.1kg、及びシリカ#600-Sの0.1kgでプレコートしたコンパクトフィルター（6インチ16段ろ紙：ADVANTEC#327）でろ過を行った。得られたろ液はプレートヒーター（日阪製作所製）による連続瞬間加熱処理（98℃、60秒）を行った後冷却し、150リットルのシクロペンテノン含有のペクチン加熱処理液を調製した。

シクロペンテノン含有のペクチン加熱処理液のpHは約3.5、酸度は6.2 ml、糖度は5.8 Brix%であった。なおpHはpHメーターで測定し、酸度は試料10 mlをpH7.0に中和するのに要する0.1N NaOH量(ml)で表示した。更に糖度はブリックス糖度計で測定した。

(2) 下記組成で飲料を調製した。

果糖ブドウ糖液糖	5.00%
砂糖	4.00%
酸味料	1.20%
香料	0.30%
シクロペンテノン含有物	0.5%
精製水	残
計	100.00%

シクロペンテノン含有物としては実施例13-(1)記載のシクロペンテノン含有ペクチン加熱処理液を使用し、その固形物換算量を添加した。この飲料100 ml中には4 mgのシクロペンテノンが含有されている。

発明の効果

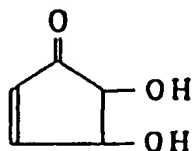
本発明により細胞にウイルス抵抗性を誘導する機能を有し、且つウイルス感染細胞を選択的に死滅させる機能を有する化合物、例えばシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される化合物を有効成分とする抗ウイルス剤が提供される。本発明の抗ウイルス剤はウイルス感染細胞を選択的に死滅させ、且つウイルス未感染の正常細胞にウイルス抵抗性を付与し、その相乗作用により、難治療性のウイルス疾患、例えばAIDS、C型肝炎等の治療及び症状改善に極めて有用な抗ウイルス剤である。また本発明により、肝機能改善作用、熱ショックタンパク誘導作用、ウイルス発がん予防作用、抗プロモーター作用等の生理活性を有するシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を含有する医薬品が提供され、該医薬品は生体の恒常性の維持、特に胃腸健康保持に有用な医薬品となる。

また本発明により細胞にウイルス抵抗性を誘導する機能を有し、且つウイルス

感染細胞を選択的に死滅させる機能を有する化合物、例えばシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される化合物を有効成分とする抗ウイルス用食品又は抗ウイルス用飲料が提供され、これらの飲食品はウイルスが起因となる種々の疾病の症状改善用飲食品又は予防用飲食品として有用である。また本発明により、肝機能改善作用、熱ショックタンパク誘導作用、ウイルス発がん予防作用、抗プロモーター作用等の生理活性を有するシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を含有する飲食品が提供され、該飲食品は生体の恒常性の維持、特に胃腸健康保持に有用な飲食品となる。

請 求 の 範 囲

1. 下記式〔I〕で表される4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つ以上の化合物を有効成分として含有することを特徴とする抗ウイルス剤。



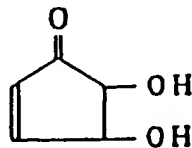
〔I〕

2. ウイルスがヒト後天性免疫不全ウイルス、又はC型肝炎ウイルスである請求の範囲1に記載の抗ウイルス剤。

3. ヒト用抗ウイルス剤、非ヒト動物用抗ウイルス剤又は植物用抗ウイルス剤である請求の範囲1記載の抗ウイルス剤。

4. 家畜、家禽、魚類又はエビ類用抗ウイルス剤である請求の範囲3記載の抗ウイルス剤。

5. 下記式〔I〕で表される4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも一つ以上の化合物を含有することを特徴とする抗ウイルス用食品又は抗ウイルス用飲料。



〔I〕

図 1

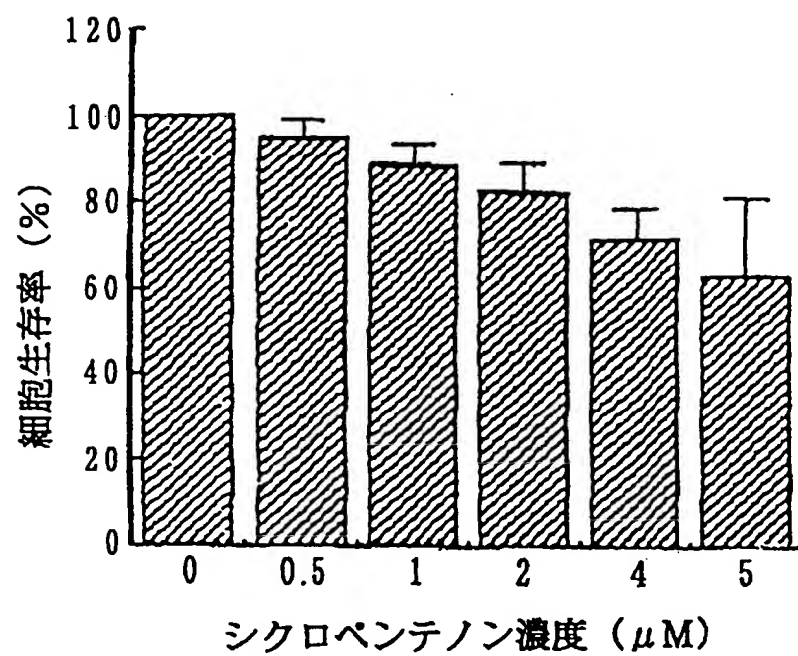


図 2

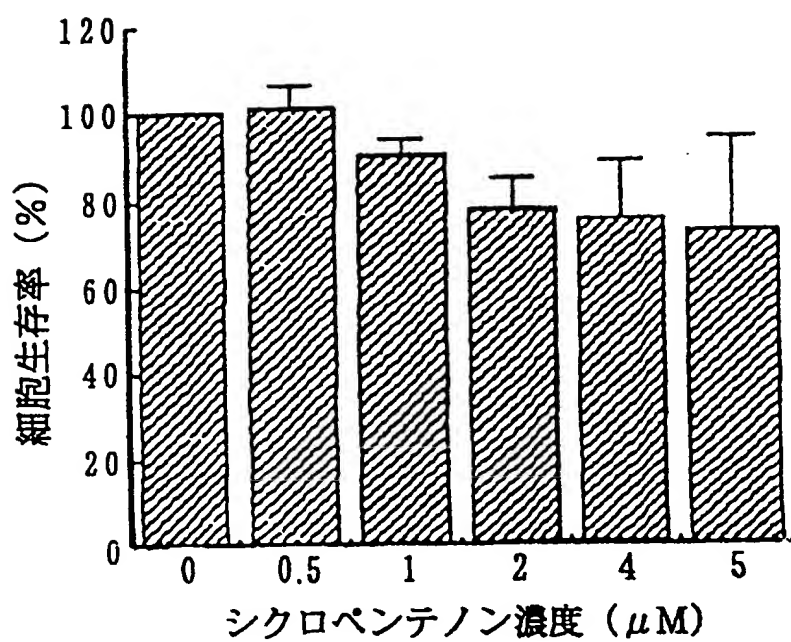


図 3

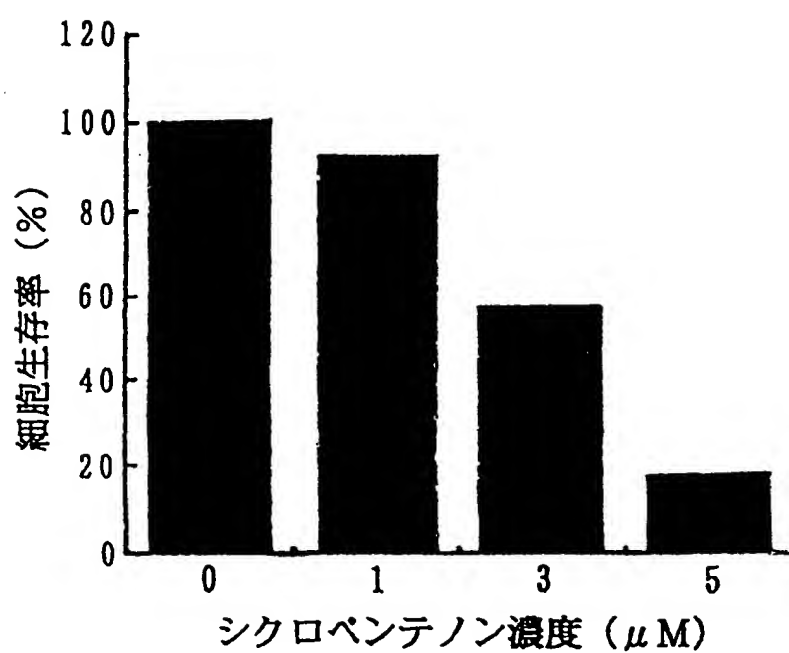


図 4

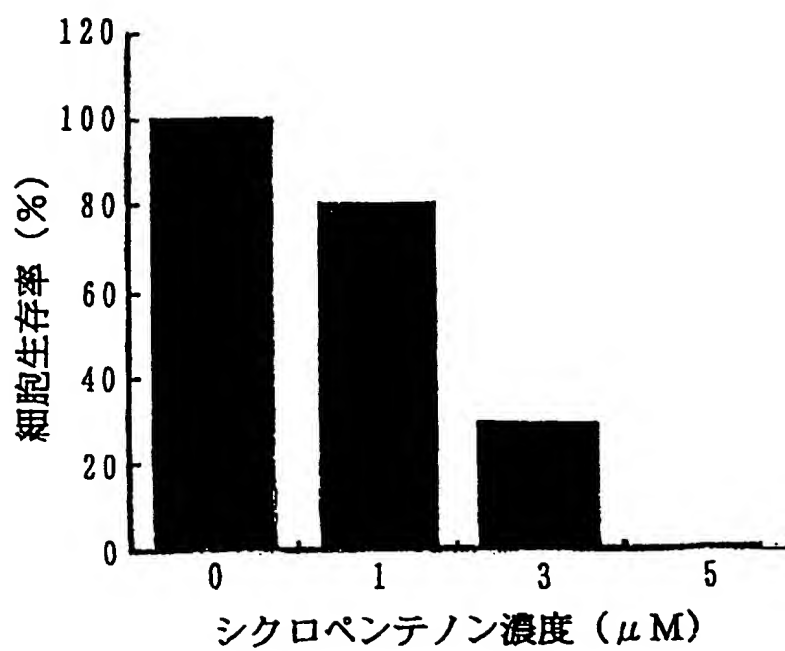


図 5

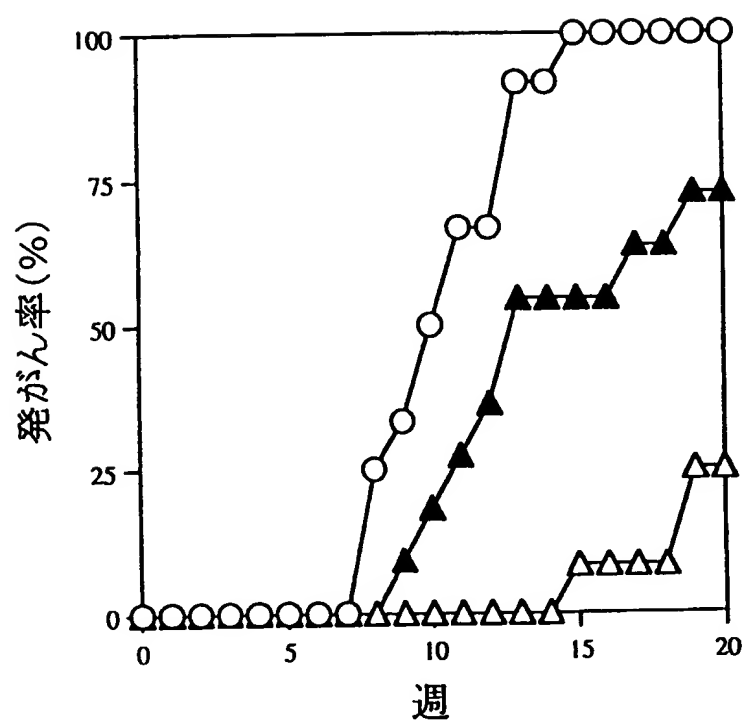


図 6

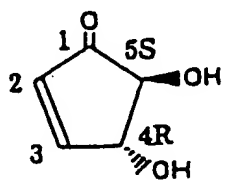
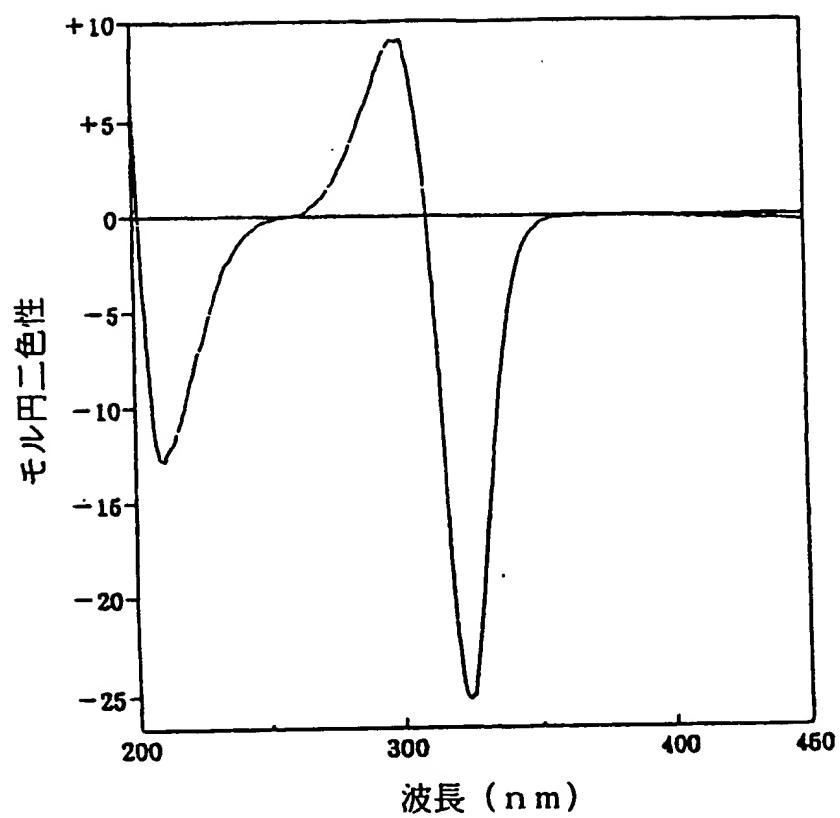
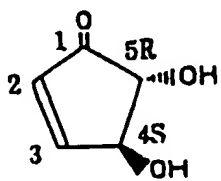
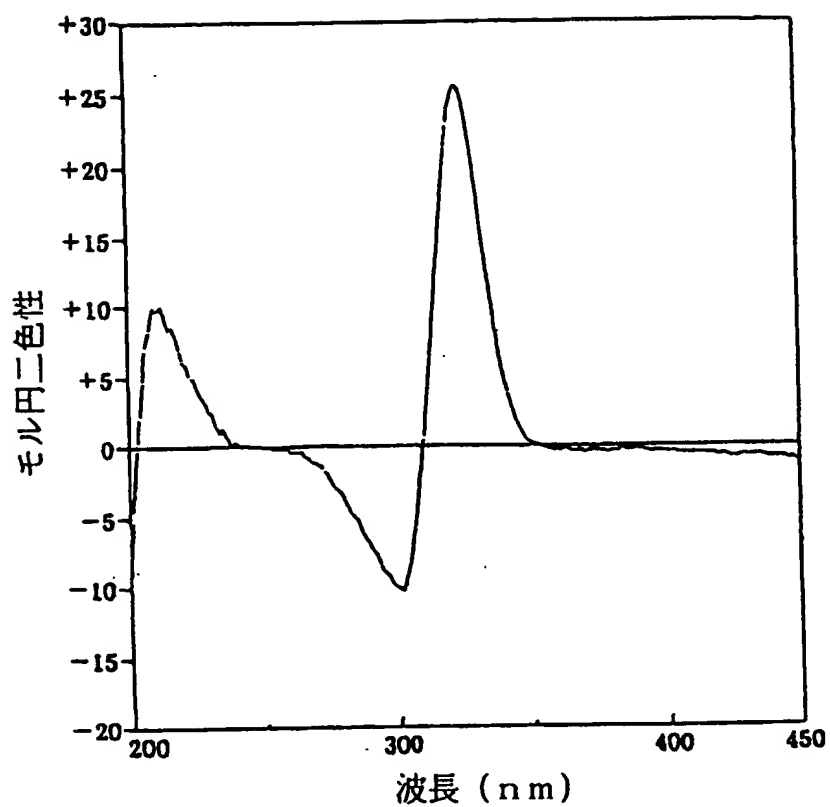


図 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/00816

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁶ A61K31/12, A23K1/16				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁶ A61K31/12, A23K1/16				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), MEDLINE (STN)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
E, A	WO, 98/13328, A1 (Takara Shyuzo Co., Ltd.), April 2, 1998 (02. 04. 98) (Family: none)	1-5		
A	JP, 50-70597, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), May 12, 1975 (12. 05. 75) (Family: none)	1-5		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="vertical-align: top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search May 13, 1998 (13. 05. 98)		Date of mailing of the international search report May 26, 1998 (26. 05. 98)		
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer		
Facsimile No.		Telephone No.		

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/00816

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ A61K31/12, A23K1/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ A61K31/12, A23K1/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
E, A	WO, 98/13328, A1 (Takara Shyuzo Co., Ltd.) 2. 4月. 1998 (02. 04. 98) (ファミリーなし)	1-5
A	J P, 50-70597, A (武田薬品工業株式会社) 12. 5月. 1975 (12. 05. 75) (ファミリーなし)	1-5

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 05. 98

国際調査報告の発送日

26.05.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信

4 C

9455

電話番号 03-3581-1101 内線 3454